

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>340086/17632</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 02133</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>08/09/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>08/09/1998</b>
Déposant  <b>INSTITUT CURIE et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

#### 4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

#### 5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

#### 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

T/FR 99/02133

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C07K16/18 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/68 C12N5/10  
A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

A	<p>FERBUS D ET AL: "Identification, nuclear localization, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 236, no. 3, 15 mars 1996 (1996-03-15), pages 991-995, XP002095518 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-17
---	--	------

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

THIS PAGE BLANK (USFIC)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LE CHALONY C ET AL: "The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 236, no. 2, 18 février 1994 (1994-02-18), pages 399-404, XP002095520 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1-17
P,A	<p>FERBUS D ET AL: "Amplification and over-expression of OZF, a gene encoding a zinc finger protein, in human pancreatic carcinomas"</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 3, 29 janvier 1999 (1999-01-29), pages 369-372, XP002095519 le document en entier</p> <p>---</p>	1-17
T	<p>DATABASE HCAPLUS 'Online! 14869, 2000</p> <p>FERBUS D ET AL: "Production and characterization of mouse monoclonal antibodies to human zinc finger OZF protein overexpressed in pancreatic carcinomas."</p> <p>XP002127523 abrégé &amp; HYBRIDOMA, vol. 18, no. 5, 1999, pages 431-6, abrégé</p> <p>-----</p>	1-17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)		
Applicant's or agent's file reference 340086/17632		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/FR99/02133	International filing date (day/month/year) 08 September 1999 (08.09.99)	Priority date (day/month/year) 08 September 1998 (08.09.98)
Applicant INSTITUT CURIE etc		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU, CN, EP, JP, KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:  
AE, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW  
Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

16 March 2000 (16.03.00) under No. WO/ 00/14118

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  J.Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



CONTINUATION OF FORM PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing ( <i>day/month/year</i> ) 16 March 2000 (16.03.00)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 340086/17632	International application No. PCT/FR99/02133

Notice is hereby given to the applicant that, at the time of issue of this notice, the time limit fixed under Rule 46.1 for filing amendments according to Article 19 had not yet expired and that the International Bureau had not received any amendments nor any statement from the applicant that he did not wish to make such amendments.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 mai 2000 (01.05.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02133	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340086/17632
Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 septembre 1999 (08.09.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 08 septembre 1998 (08.09.98)
Déposant GOUBIN, Gérard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

27 mars 2000 (27.03.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
20, rue de Chazelles  
F-75847 Paris Cedex 17  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

08 mars 2001 (08.03.01)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

340086/17632

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR99/02133

Date du dépôt international (jour/mois/année)

08 septembre 1999 (08.09.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant☐ l'inventeur☒ le mandataire☐ le représentant commun

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-45-00-92-02

no de télécopieur

01-45-00-46-12

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne☐ le nom☒ l'adresse☐ la nationalité☐ le domicile

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
20, rue de Chazelles  
F-75847 Paris Cedex 17  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-44-29-35-00

no de télécopieur

01-44-29-35-99

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur☐ aux offices désignés concernés☐ à l'administration chargée de la recherche internationale☒ aux offices élus concernés☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international☐ autre destinataire:Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Yolaine CUSSAC

no de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 10 NOV 2000

WIPO

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

16T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340086/17632	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02133	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/09/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 08/09/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/18		
Déposant INSTITUT CURIE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.



2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☒ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 27/03/2000	Date d'achèvement du présent rapport 09.11.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé  Renggli, J  N° de téléphone +49 89 2399 7461 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# **RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02133

## **I. Bas du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

### **Description, pages:**

1-31                      version initiale

### **Revendications, N°:**

1-17                      version initiale

### **Dessins, feuilles:**

1/7-7/7                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,              feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

## **II. Priorité**

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
  - ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

**3. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**voir feuille séparée**

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-17
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-17
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-17
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## **Section II:**

La présente demande revendique la priorité de la demande FR 98 11204, déposée le 8 septembre 1998.

La priorité revendiquée est valable pour les revendications 1-4 et 6 de la présente demande (Art. 8 PCT).

Par contre, l'objet des revendications 5 et 9 qui concerne, respectivement, les anticorps et partiellement l'hybridôme produisant lesdits anticorps et déposé à la CNCM le 6 septembre 1999 sous le numéro I-2308 ne bénéficie pas de la date de priorité revendiquée. Par conséquent, les revendications 7, 8 et 10-17 qui se réfèrent aux revendications 5 et/ou 9 ne bénéficient également pas de la date de priorité.

La date de dépôt de la présente demande est donc la date pertinente pour les revendications 5 et 7-17, soit le 8.9.1999.

Par conséquent, le document D3 cité comme document P dans le rapport de recherche (voir section V, publié le 29.1.1999), constitue un document de l'art antérieur comme défini dans l'Article 33 et la Règle 64.1 PCT et pouvant être utilisé pour l'évaluation de la nouveauté et de l'inventivité des revendications 5 et 7-17 de la présente demande.

## **Section V:**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1 Ferbus D. et al., Eur. J. Biochem, 1996, Vol. 236, pp. 991-995  
D2 Le Chalony C. et al, J. Mol. Biol., 1994, Vol. 236, pp. 399-404  
D3 Ferbus D. et al., Int. J. Cancer, 1999, Vol. 80, pp. 369-372

2. Application industrielle (Art. 33(4) PCT):

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Le contenu des revendications 1-17 est susceptible d'application industrielle.

3. Nouveauté (Art. 33(2) PCT):

Les documents D1 et D3, qui sont considérés comme l'état de la technique le plus proche, décrivent tous deux des anticorps polyclonaux anti-OZF (cf. D1, page 992, chapitre "generation of antibodies" et "purification of OZF antibody"; cf. D3, page 369, chapitre "production of antibodies").

L'objet de la revendication 1 diffère donc de D1 en ce que un anticorps monoclonal anti-OZF est revendiqué. Cette revendication est donc nouvelle par rapport au document D1. Il s'ensuit que les revendications 2-17 sont également nouvelles.

Pour la même raison, les revendications 5 et 7-17 sont nouvelles par rapport au document D3 (voir section II ci-dessus).

4. Activité inventive:

Le document D1 décrit des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine OZF. Ces anticorps ont permis la détection et l'étude de la protéine OZF.

Le problème résolu par la revendication 1 de la présente demande peut donc être considéré comme la mise à disposition d'une alternative.

La solution à ce problème est l'anticorps monoclonal de la revendication 1.

Cette solution est triviale pour l'homme du métier. Les anticorps monoclonaux et leur mode de production sont largement connus dans l'art antérieur et cette solution n'est donc pas inventive. Par conséquent, la revendication 9 qui a pour objet un hybridôme n'est également pas inventive. Les avantages des anticorps monoclonaux sont également bien connus, par exemple leur stabilité/reproductibilité qui procurent des avantages évidents, par exemple lors d'applications cliniques.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Concernant les revendications 2, 6, 7 et 8, il est noté que D1 démontre qu'une lignée tumorale surexprime OZF et en conclut que la protéine pourrait jouer un rôle dans la carcinogénèse (voir D1 page 994, premier paragraphe, 1e colonne et dernière phrase, 2e colonne). De plus, D2 démontre que la protéine OZF est surexprimée dans des cellules transformées (voir le document en entier).

Ainsi, le choix de OZF humain, ainsi que le développement d' anticorps anti-OZF marqués ou couplés à des agents cytotoxiques pour l' imagerie, le diagnostic ou la thérapie du cancer est une option logique pour l'homme du métier ayant connaissance de D1 et D2. Ces types d'applications sont largement répandues dans la lutte par anticorps contre le cancer. Les revendications 2, 6, 7 et 8 ne sont donc pas considérées comme inventives.

Concernant les compositions, utilisations, trousse et méthode revendiquées dans les revendications 10-17 de la présente demande, il s'agit également d'adaptations évidentes et donc non-inventives pour l'homme du métier connaissant les documents D1 et D2.

Le document D3 (pertinent pour les revendications 5 et 7-17) renforce d'ailleurs cette analyse puisqu' il démontre également le rôle de OZF dans différents types de cancers (voir le document en entier).

A la lumière des documents cités, les revendications 1, 2 et 6-17 ne sont donc pas inventives (Art. 33(3) PCT).

Concernant les revendications 3-5, qui ont pour objet des anticorps reconnaissant la partie N-terminale, la partie N-terminale et la tyrosine 10 ou l'anticorps produit par la cellule déposée au CNCM sous le numéro I-2308, il semblerait ressortir de la description de la demande que ces anticorps auraient une réactivité croisée plus limitée que des anticorps dirigés contre d'autres parties de la protéine OZF. Même si cela était le cas, il ressort clairement du document D2 (voir page 402, 1e colonne, 2e paragraphe) que la région N-terminale est l'unique région de OZF qui ne présente pas d'homologie avec les protéines connues des banques de données. L'homme du métier désirant mettre au point un anticorps anti-OZF plus spécifique choisirait donc immédiatement la région N terminale comme

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

immunogène. Les revendications 3, 4 et 5 ne sont donc pas inventives.

## **Section VII**

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D3 et ne cite pas ce document.
2. Le certificat de dépôt relatif aux cellules I-2308 déposées au CNCM le 6.9.99 ne figure apparemment pas au dossier (Règle 13bis PCT).

## **Section VIII**

1. La caractéristique "N-terminale" a un sens relatif et laisse par conséquent un doute quant à la spécificité précise des anticorps des revendications 3 et 4. L'objet desdites revendications n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT et Directives PCT, section IV, III-4.5).
2. La méthode de la revendication 17 n'est pas clairement définie (Art. 6 PCT). L'étape b) de la méthode indique que la quantité d'anticorps est mesurée. Il n'est pas clair si les anticorps fixés sont détectés et/ou les anticorps en solution. Il est de plus noté que le composé à tester et l'anticorps n'ont pas la même spécificité (voir aussi page 12 de la description de la demande). Les étapes essentielles au succès de la méthode auraient dû être clairement identifiées (Directives PCT, Section IV, III-4.4).
3. Les termes telle/tel que et notamment, utilisés dans les revendications 9, 12 et 13 rendent les caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent optionnelles et introduisent un manque de clarté dans les revendications (article 6 PCT et directives, section IV, III-4.6 PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

09/1788722  
Translation  
0500

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340086/17632	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02133	International filing date (day/month/year) 08 September 1999 (08.09.99)	Priority date (day/month/year) 08 September 1998 (08.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/18		
Applicant INSTITUT CURIE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of        sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 March 2000 (27.03.00)	Date of completion of this report 09 November 2000 (09.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02133

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-31, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-17, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/02133

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II

The present application claims the priority of application FR 98 11204, filed on 8 September 1998.

The claimed priority is valid for Claims 1-4 and 6 of the present application (PCT Article 8).

However, the subject matter of Claims 5 and 9 relating to antibodies and partially to hybridoma producing said antibodies and deposited at the CNCM on 6 September 1999 under number I-2308, respectively, does not have the claimed priority date. Therefore, neither do Claims 7, 8 and 10-7, which refer to Claims 5 and/or 9, have the claimed priority date.

Therefore, the filing date of the present application is relevant for Claims 5 and 7-17, namely 8.9.1999.

Therefore, document D3, which is cited as a P document in the search report (see Box V, published on 29.1.1999), is a prior art document as defined in PCT Article 33 and PCT Rule 64.1 and can be used to assess the novelty and inventive step of Claims 5 and 7-17 of the present application.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/02133

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

## 1. Reference is made to the following documents:

D1: Ferbus D. et al., Eur. J. Biochem, 1996, Vol. 236, pp. 991-995

D2: Le Chalony C. et al., J. Mol. Biol., 1994, Vol. 236, pp. 399-404

D3: Ferbus D. et al., Int. J. Cancer, 1999, Vol. 80, pp. 369-372.

## 2. Industrial applicability (PCT Article 33(4)):

The content of Claims 1-17 is industrially applicable.

## 3. Novelty (PCT Article 33(2)):

Documents D1 and D3, which are considered to be the closest prior art, both describe polyclonal anti-OZF antibodies (cf. D1, page 992, chapter "generation of antibodies" and "purification of OZF antibody"; cf. D3, page 369, chapter "production of antibodies").

Therefore, the subject matter of Claim 1 differs from D1 in that a monoclonal anti-OZF antibody is

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

claimed. Therefore, this claim is novel over document D1. It follows that Claims 2-17 are also novel.

For the same reason, Claims 5 and 7-17 are novel over document D3 (see Box II above).

4. Inventive step:

Document D1 describes polyclonal antibodies directed against OZF protein. These antibodies enable OZF protein to be detected and studied.

Therefore, the problem solved by Claim 1 of the present application could be considered to be that of providing an alternative.

The solution to this problem is the monoclonal antibody of Claim 1.

This solution is trivial for a person skilled in the art. Monoclonal antibodies and their production method are widely known in the prior art and this solution is not, therefore, inventive. Consequently, neither is Claim 9, which relates to a hybridoma, novel. The advantages of monoclonal antibodies are also well-known: for example, their stability/reproducibility which lead to obvious advantages, for instance in clinical applications.

With regard to Claims 2, 6, 7 and 8, it is noted that D1 shows that a tumour cell line over-expresses OZF and thus concludes that the protein could play a role in carcinogenesis (see D1, page 994, first paragraph, 1<sup>st</sup> column and last sentence, 2<sup>nd</sup> Column).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Furthermore, D2 shows that the OZF protein is over-expressed in transformed cells (see the whole document).

Therefore, choosing human OZF, as well as developing anti-OZF antibodies which are labelled or coupled to cytotoxic agents for the imaging, diagnosis or therapy of cancer is a logical option for a person skilled in the art with knowledge of D1 and D2. These types of applications are widespread in the fight against cancer using antibodies. Therefore, Claims 2, 6, 7 and 8 are not considered to be inventive.

The compositions, uses, kit and method claimed in Claims 10-17 of the present application, also refer to obvious adaptations and, therefore, would not be inventive for a person skilled in the art with knowledge of documents D1 and D2.

Moreover, document D3 (relevant to Claims 5 and 7-17) reinforces this assessment since it also shows the role of OZF in different types of cancers (see the whole document).

Therefore, in light of the cited documents, Claims 1, 2 and 6-17 are not inventive (PCT Article 33(3)).

With regard to Claims 3-5, which have as their subject matter antibodies recognizing the N-terminal portion, the N-terminal portion and 10 tyrosine or the antibody produced by the cell deposited at the CNCM under number I-2308, the description of the application appears to show that these antibodies would have a more limited cross reactivity than

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



antibodies directed against other parts of the OZF protein. Even if this were the case, it is clear from document D2 (see page 402, 1<sup>st</sup> column, 2<sup>nd</sup> paragraph) that the N-terminal region is the only OZF region which is not homologous with proteins known from data banks. A person skilled in the art wishing to develop a more specific anti-OZF antibody would, therefore, immediately choose the N-terminal region as an immunogen. Therefore, Claims 3, 4 and 5 are not inventive.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/02133

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1 (a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in document D3, nor does it cite this document.
2. The filing certificate relating to I-2308 cells deposited at the CNCM on 6.9.99 apparently does not appear in the file (PCT Rule 13bis).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The feature "N-terminal" has a relative sense and consequently leaves doubt as to the precise specificity of the antibodies of Claims 3 and 4. Therefore, the subject matter of said claims is not clearly defined (PCT Article 6 and PCT Guidelines, Chapter III-4.5).
2. The method of Claim 17 is not clearly defined (PCT Article 6). Step (b) of the method indicates that the amount of antibodies is measured. It is not clear whether the bound antibodies are detected and/or the antibodies in solution form. It is furthermore noted that the composition to be tested and the antibody do not have the same specificity (see also page 12 of the description of the application). Steps which are essential for the success of the method should have been clearly identified (PCT Guidelines, Chapter III-4.4).
3. The terms such as and especially used in Claims 9, 12 and 13 render the technical features to which they refer optional and confer a lack of clarity to the claims (PCT Article 6 and PCT Guidelines, Chapter III-4.6).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 16/18, A61K 39/395, 49/00, G01N 33/68, C12N 5/10, A61K 47/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/14118</b> <b>(43) Date de publication internationale: 16 mars 2000 (16.03.00)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02133 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 8 septembre 1999 (08.09.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/11204 8 septembre 1998 (08.09.98) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75005 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> GOUBIN, Gérard [FR/FR]; 6, cité Bergère, F-75009 Paris (FR). FERBUS, Didier [FR/FR]; 10, rue de Reims, F-75013 Paris (FR). MULIERIS, Martine [FR/FR]; 11, rue Geoffroy Saint Hilaire, F-75005 Paris (FR). PROSPERI, Marie-Thérèse [FR/FR]; 6, rue Achille Martinet, F-75018 Paris (FR). <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> OZF PROTEIN-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR DIAGNOSTIC THERAPEUTIC USES <b>(54) Titre:</b> ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-PROTEINE OZF ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DIAGNOSTIC ET THERAPEUTIQUE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns an OZF protein-specific monoclonal antibody and a pharmaceutical composition comprising said antibody for preventing, treating or diagnosing pathology related with abnormal OZF protein expression such as cancer. The invention further concerns methods for detecting OZF protein and methods for selecting compounds capable of interacting with the OZF protein.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne un anticorps monoclonal spécifique de la protéine OZF ainsi qu'une composition pharmaceutique comprenant ledit anticorps, destinée à la prévention, le traitement ou le diagnostic de pathologie liée à l'expression anormale de protéine OZF telle que le cancer. L'invention comprend en outre des méthodes de détection de la protéine OZF ainsi que des méthodes de sélection de composés capables d'interagir avec la protéine OZF.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						



## ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-PROTEINE OZF ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DIAGNOSTIC ET THERAPEUTIQUE.

La présente invention concerne un anticorps monoclonal spécifique de la protéine OZF ainsi qu'une composition pharmaceutique comprenant ledit anticorps destinée à la prévention, le traitement ou le diagnostic de pathologie liée à l'expression anormale de protéine OZF telle que le cancer. L'invention comprend en outre des méthodes de détection de la protéine OZF ainsi que des méthodes de sélection de composés capables d'interagir avec la protéine OZF.

La plupart des protéines à motifs doigt à zinc sont caractérisées par leur capacité à se fixer sur des ARN ou des ADN. Ce motif doigt à zinc a été retrouvé dans des gènes contrôlant le développement, des gènes de facteur de transcription ou des gènes liés à la formation de tumeurs, attestant ainsi l'importance de cette structure doigt à zinc dans la régulation de l'expression des gènes.

Parmi les gènes codant pour ces protéines à motifs doigt à zinc, un gène codant pour une protéine constituée uniquement de motifs doigt à zinc, dénommé gène OZF (OZF pour « Only Zinc Fingers ») a été isolé (Le Chalony et al., 1994) et l'ADNc correspondant a été cloné et séquencé. La séquence d'acides aminés de la protéine putative codée par le gène OZF comporte 292 résidus d'acides aminés, dont 10 motifs doigt à zinc de 28 résidus d'acides aminés, pour un poids moléculaire estimé de 33 kDa. L'analyse comparative de la protéine OZF a montré que le domaine contenant la structure doigt à zinc comporte de grandes homologies avec d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

D'autre part, Ferbus et al. (Ferbus et al., 1996) ont pu mettre en évidence certaines caractéristiques de la protéine OZF à partir d'une protéine recombinante OZF produite chez E. coli. En particulier, ces auteurs ont montré que la protéine OZF recombinante était capable de fixer des ions de zinc, de l'ADN et de l'héparine. En outre, ces auteurs ont également pu montrer, en utilisant un anticorps polyclonal obtenu à partir d'une protéine recombinante OZF fusionnée avec une protéine fixant le maltose (MBP) que la protéine OZF était exprimée dans des cellules mammaires humaines de type épithélial, préférentiellement dans le noyau, alors qu'elle était très faiblement exprimée dans les cellules myoépithéliales et stromatiques de ce tissu mammaire. Ces auteurs ont également pu mettre en évidence que la protéine OZF était exprimée dans une lignée cellulaire tumorale établie à partir d'une tumeur de pancréas.

Les inventeurs ont mis en évidence de manière surprenante, en utilisant des anticorps polyclonaux anti-protéine OZF, que la protéine OZF était surexprimée dans des tumeurs primaires qui présentaient une amplification du gène OZF mais aussi dans des tumeurs primaires qui ne présentaient pas d'amplification du gène.

5 D'autre part, les inventeurs ont également mis en évidence que la surexpression de la protéine OZF dans ces tumeurs primaires était restreinte aux cellules tumorales.

Ces résultats montrent ainsi que la protéine OZF apparaît comme un marqueur de cellules tumorales.

10 L'obtention d'anticorps capables de reconnaître de manière spécifique la protéine OZF permettrait ainsi de détecter des cellules tumorales caractérisées par une expression anormale de protéine OZF.

Des anticorps polyclonaux anti-protéine OZF ont déjà été décrits (Ferbus et al., 1996). Ces anticorps ont été préparés par immunisation de lapins contre une protéine recombinante obtenue par fusion de la protéine OZF et de la protéine MBP, puis purifiés sur immunoabsorbant constitué de la protéine recombinante fusionnée OZF-MBP couplée sur colonne de sépharose 4B. Ces anticorps polyclonaux peuvent ainsi reconnaître plusieurs épitopes de la protéine OZF et en particulier certains épitopes communs aux protéines humaines ou de mammifères à motifs de doigt à zinc, compte tenu de la grande homologie de séquence constatée entre la protéine OZF et d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

20 Les inventeurs ont pu ainsi mettre en évidence des réactions non spécifiques obtenues avec certaines protéines à motifs de doigt à zinc pour ces anticorps polyclonaux.

25 Si ces anticorps polyclonaux peuvent s'avérer de spécificité suffisante pour des applications particulières telles que la détection de protéine OZF dans des cellules ou des tissus homogènes isolés, leur spécificité et éventuellement leur affinité pourraient s'avérer insuffisantes comme le reconnaissent d'ailleurs les auteurs de la publication décrivant ces anticorps polyclonaux. Ces auteurs précisent en effet dans leur conclusion qu'il serait nécessaire de disposer d'anticorps anti-OZF permettant d'identifier avec précision les types de cellules exprimant la protéine OZF. L'obtention de tels anticorps, dirigés contre un épitope spécifique de la protéine OZF humaine, permettrait sans aucun doute non seulement d'identifier les types de cellules exprimant normalement ou anormalement la protéine OZF mais également de rechercher les

séquences nucléiques cibles de la protéine OZF, notamment nucléaires, et d'identifier les gènes susceptibles d'être régulés par la protéine OZF.

Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de disposer d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la protéine OZF humaine. Un tel anticorps pourrait non seulement être utile pour étudier et ainsi mieux connaître le rôle joué par la protéine OZF dans la régulation des gènes mais également serait utile au regard des résultats présentés par les inventeurs dans la présente invention, pour d'autres applications comme les applications thérapeutiques, diagnostics, notamment *in vivo* ou *in vitro* à partir d'échantillon biologique hétérogène, ou pour le ciblage de composés capables de moduler l'activité biologique de la protéine OZF.

La présente invention est basée sur la découverte de la possibilité d'obtenir par une approche particulière de préparation un anticorps monoclonal caractérisé par une spécificité jamais encore obtenue antérieurement. Il a ainsi été découvert qu'en immunisant une souris avec une protéine OZF recombinante, il est possible d'obtenir un anticorps reconnaissant un épitope spécifique de la protéine OZF et qui ne reconnaît pas d'autres protéines à motifs doigt à zinc de mammifères.

Ainsi, la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal ou un de ses fragments capables de se fixer spécifiquement sur un épitope de la protéine OZF, de préférence humaine.

On entend désigner par épitope dans la présente description, tout déterminant de la protéine responsable de l'interaction spécifique avec l'anticorps. Les déterminants épitopiques consistent habituellement en des groupes de molécules présentant des surfaces chimiquement actives telles que des acides aminés ou des chaînes latérales de sucres et ayant une structure tridimensionnelle spécifique et/ou une charge spécifique caractéristique.

Les fragments d'anticorps monoclonal selon l'invention comprennent tout fragment dudit anticorps monoclonal capable de se fixer sur l'épitope de la protéine OZF sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal dont ledit fragment est issu. Des exemples de tels fragments incluent en particulier des anticorps monoclonaux simple chaîne ou des fragments monovalents Fab ou Fab' et des fragments divalents tels que F(ab')<sub>2</sub>, qui possèdent la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal dont ils sont issus. Un fragment selon l'invention pourra également être un fragment Fv simple chaîne produit par des méthodes connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Skerra et al., 1988 et King et al., 1991.

Selon la présente invention, des fragments d'anticorps monoclonaux de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique.

5 D'une autre manière les fragments d'anticorps monoclonaux compris dans la présente invention peuvent être synthétisés par des synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc., ou peuvent être préparés manuellement en utilisant des techniques connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Geysen et al., 1978.

10 En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux ou leurs fragments, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow et al., 1988) ou à la technique de préparation à partir d'hybridomes décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par exemple  
15 à partir de cellule d'un animal immunisé contre la protéine OZF, ou un de ses fragments, comportant l'épitope reconnu spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux selon l'invention. Ladite protéine OZF, ou un de sesdits fragments, pourra notamment être produite, selon les modes opératoires usuels, par recombinaison génétique à partir d'une séquence d'acide nucléique contenue dans la  
20 séquence de l'ADNc codant pour la protéine OZF ou par synthèse peptidique à partir d'une séquence d'acides aminés comprise dans la séquence peptidique de la protéine OZF.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention pourront par exemple être purifiés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été immobilisée la protéine OZF  
25 ou un de ses fragments comportant l'épitope reconnu spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux selon l'invention.

De préférence, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la présente invention se fixe sur l'épitope linéaire ou conformationnel du domaine N-terminal de la protéine OZF humaine dont la séquence présente un faible taux d'homologie  
30 comparée avec les séquences d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

De manière plus préférée, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention se fixe sur un épitope situé sur les quinze premiers acides aminés, du domaine N-terminal de la protéine OZF telle que décrite par Le Chalony et al., 1994, aux figures 1B et 1C page 400.

Ainsi, l'invention concerne un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est située sur la partie N-terminale.

De manière préférée, l'invention concerne un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est situé sur la partie N-terminale comprenant le résidu tyrosine situé en position 10 de la séquence de la protéine OZF humaine telle que décrite par Le Chalony et al., 1994, à la figure 1B page 400, de préférence ledit épitope est porté par le fragment de séquence aa7-aa17 de ladite séquence OZF humaine.

De manière également préférée, l'invention concerne un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître en outre la protéine OZF humaine dont la séquence présente un polymorphisme lysine/arginine en position 8 de la séquence de la protéine OZF humaine telle que décrite par Le Chalony et al., 1994, à la figure 1B page 400.

Parmi les anticorps monoclonaux selon l'invention, on préfère notamment l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments caractérisé en ce qu'il est produit par une cellule telle que déposée au Centre National de Culture de Microorganisme (CNCM) (Institut Pasteur, Paris, France) le 6 Septembre 1999 sous le numéro I-2308.

L'hybridome tel que déposé à la CNCM le 6 Septembre 1999 sous le numéro I-2308, fait également partie de la présente invention.

L'invention comprend en outre un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps humanisés, chimériques ou anti-idiotypes.

Les anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (Carter et al., 1992 ; Singer et al., 1992 et Mountain et al., 1992). De tels anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de diagnostic *in vivo* et thérapeutiques.

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments de type chimérique selon l'invention peuvent être réalisés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, l'anticorps monoclonal chimérique pourra être réalisé en clonant un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable d'un anticorps monoclonal selon l'invention et une séquence codant pour la région constante d'anticorps humain. Un anticorps chimérique de l'invention codé par un tel gène recombinant sera par exemple une chimère souris-homme, la

spécificité de cet anticorps étant déterminée par la région variable dérivée de l'ADN murin et son isotype déterminé par la région constante dérivée de l'ADN humain (Verhoeven et al., 1988).

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon la présente invention  
5 incluent également des anticorps anti-idiotypes produits par des méthodes connues de l'homme de l'art (Cozenza, et al., 1976 et Harlow et al., 1988).

Sont également compris dans l'invention, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon la présente invention obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique.

10 L'invention comprend également un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est marqué.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention ou leurs fragments peuvent également, selon l'invention, se présenter sous forme d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

15 Les anticorps monoclonaux marqués selon l'invention ou leurs fragments incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués par exemple avec des enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétyl-cholinestérase, le lysozyme, la malate déhydrogénase ou la glucose-6  
20 phosphate déhydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux anticorps monoclonaux ou leurs fragments de l'invention et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, le fluorochrome, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent Protein »), le dansyl, l'umbelliférone  
25 etc.. Dans de tels conjugués, les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent être couplés aux enzymes ou aux marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que le périodate etc.. Les conjugués comportant des marqueurs de type fluoréscéine  
30 peuvent être préparés par réaction avec un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimioluminescents tels que le luminol et les dioxétanes ou des marqueurs  
35 bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine.

Parmi les marqueurs pouvant être fixés sur l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, on préfère également les marqueurs radioactifs tels que  $^{14}\text{C}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{75}\text{SE}$  et  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  qui peuvent être détectés par des moyens connus tels que le compteur gamma ou à scintillations, par autoradiographie, etc..

La présente invention comprend également les anticorps monoclonaux marqués ou leurs fragments selon l'invention dans lesquels le conjugué peut être un marqueur détectable choisi parmi les marqueurs pouvant être utilisés dans l'application imagerie *in vivo*. Des exemples de tels marqueurs selon l'invention sont  $^{72}\text{As}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$  et  $^{89}\text{Zr}$ .

Le terme « imagerie *in vivo* » doit être entendu dans la présente description comme toute méthode permettant la détection d'un anticorps monoclonal marqué selon la présente invention ou un de ses fragments qui se fixe spécifiquement sur l'épitope de la protéine OZF dans le corps du patient. Le patient sera de préférence un homme susceptible de présenter des cellules tumorales exprimant de manière anormale la protéine OZF.

La présente invention comprend également les anticorps monoclonaux marqués ou leurs fragments selon l'invention dans lesquels le conjugué peut être un marqueur choisi parmi les marqueurs paramagnétiques pouvant être utilisés dans l'application imagerie *in vivo*. De tels marqueurs selon l'invention sont par exemple les isotopes paramagnétiques particulièrement utilisés dans l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et qui incluent notamment  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{157}\text{Gd}$  et  $^{55}\text{Mn}$ .

Tel que mentionné précédemment, pour la préparation de conjugués d'anticorps monoclonaux, le marqueur isotopique ou paramagnétique pourra être fixé sur l'anticorps selon l'invention ou un de ses fragments soit directement ou soit indirectement en utilisant un groupe fonctionnel intermédiaire. Selon l'invention, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments peut être marqué par toute technique connue de l'homme de l'art telle que par exemple celles décrites par Wagner et al., 1979 et Saha et al., 1976. Les conjugués monoclonaux radiomarqués selon la présente invention peuvent par exemple être iodinés par contact avec du iodure de sodium ou de potassium et d'un agent chimique oxydant tel que l'hypochlorite de sodium ou un agent oxydant enzymatique tel que la lactopéroxydase.

Le type de détection de l'instrument utilisé sera un facteur majeur dans la sélection du marqueur. Par exemple, les isotopes radioactifs ou paramagnétiques seront choisis, en particulier pour l'imagerie *in vivo*, en fonction du type d'instrument

utilisé qui guidera la sélection de ces marqueurs. De préférence, les marqueurs radioactifs choisis devront avoir une période qui est détectable par le type d'instrument choisi. Ces anticorps monoclonaux pourront ainsi être utilisés par exemple comme agent d'imagerie, *in vivo* ou *ex vivo* sur des prélèvements biologiques dans toute  
5 méthode conventionnelle permettant de visualiser par image un diagnostic de pathologie lié à l'expression anormale de la protéine OZF. Ces agents d'imagerie ou les réactifs pour diagnostic *in vitro* caractérisés en ce qu'ils comprennent un anticorps monoclonal marqué selon l'invention ainsi que leurs utilisations dans des méthodes de diagnostic *in vitro* ou de diagnostic par imagerie *in vivo* pour le diagnostic de pathologie  
10 liée à l'expression anormale de la protéine OZF font bien entendu partie de la présente invention.

L'invention comprend également un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est couplé à un composé cytotoxique.

15 Les agents cytotoxiques qui peuvent être conjugués aux anticorps monoclonaux selon l'invention incluent notamment, mais sans s'y limiter, des composés alkylants tels que la méchloréthamine, la triéthylène phosphoramidate, la triaziquone, la camustine, la sémustine, le méthotrexate, la mercaptopurine, la cytarabine, le fluorouracile, des antibiotiques tels que l'actinomycine, des hormones ou  
20 des antagonistes d'hormones tels que les corticostéroïdes, comme la prednisone ou les progestines. Les conjugués anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être préparés en conjuguant des substances cytotoxiques contenant soit la toxine intacte ou soit leur chaîne A dérivée avec l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon des techniques de l'homme de l'art (Chaudry et al., 1993 ; Sung et al., 1993 et  
25 Selvaggi et al., 1993).

L'anticorps monoclonal selon l'invention peut également être un anticorps monoclonal hétéroconjugué tel qu'une molécule hybride composée de deux ou plusieurs anticorps. Un hétéroconjugué inclut par exemple un anticorps monoclonal simple chaîne selon l'invention et un anticorps monoclonal simple chaîne qui est  
30 spécifique d'un récepteur cellulaire (Kerr et al., 1990 et Hsieh-Ma et al., 1992).

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique pour le traitement, la prévention ou pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments, selon l'invention ; et
- 35 b) un excipient pharmaceutiquement acceptable.



De préférence, la composition pharmaceutique selon l'invention, est caractérisée en ce que ladite pathologie est choisie parmi les cancers, notamment le cancer du pancréas, du côlon ou du sein.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement du cancer, notamment le cancer du pancréas, le cancer du côlon ou le cancer du sein.

10 En général, la dose d'anticorps monoclonaux marqués ou un de leurs fragments pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, pourra varier en fonction de paramètres tels que l'âge, les conditions, le sexe, de l'étendue de la maladie du patient, de contre-indications s'il en existe, de thérapies concomitantes ou d'autres variables qu'un homme de l'art saura ajuster.

15 L'administration de ces composés au patient peut être locale ou systémique et accomplie par voie intraveineuse, intra-artérielle, par l'intermédiaire du liquide spinal, etc.. L'administration peut être également effectuée par voie intradermique ou par voie intracavitaire, orale ou nasale, en fonction de la partie du corps qui doit être examinée. Après un temps suffisant permettant à l'anticorps monoclonal de se fixer sur la protéine OZF, par exemple de 30 minutes à 48 heures, on examine la partie du corps qui doit être examinée par les techniques d'imagerie classiques telles que l'IRM, ou l'imagerie  
20 par scintillation. Le protocole exact dépendra nécessairement de facteurs spécifiques liés au patient, de la partie du corps à examiner, de la méthode d'administration et du type des marqueurs utilisés. Les procédures spécifiques pourront être déterminées par l'homme de l'art. La distribution des isotopes radioactifs fixés et leur décroissance avec le temps sera ensuite enregistrée et contrôlée. En comparant les résultats obtenus  
25 avec ceux obtenus pour des individus cliniquement normaux, la présence et la localisation de cellules tumorales pourront être déterminées et contrôlées.

La quantité d'anticorps monoclonaux comprise dans les compositions pharmaceutiques selon la présente invention et nécessaire pour une thérapie efficace dépendra de différents facteurs tels que le mode d'administration, la partie du corps  
30 ciblée, l'état physiologique du patient, de l'administration d'autres médicaments, des éventuels effets secondaires, etc.. Le dosage pour de telles préventions ou traitements thérapeutiques devra être réalisé de manière à optimiser sa sécurité et son efficacité. En général, les dosages utilisés *in vitro* peuvent fournir une indication pour les quantités utilisées pour l'administration d'anticorps monoclonaux *in situ* t ainsi des  
35 modèles animaux peuvent être utilisés pour déterminer les quantités efficaces

d'anticorps monoclonaux selon l'invention pour le traitement de pathologie particulière. Ces méthodes sont en particulier discutées dans les ouvrages tels que Gilman et al. (1990) et Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) pour des méthodes d'administration telles que les méthodes par voie orale, intraveineuse, intrapéritonale, intramusculaire ou transdermique. Les excipients pharmaceutiquement acceptables incluent notamment l'eau, les solutions salines, les tampons ou tout autre composé décrit par exemple dans l'Index de Merck.

L'invention comprend en outre l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments pour le traitement, la prévention ou pour le diagnostic *in vitro* ou *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, notamment pour le traitement, la prévention ou le diagnostic de cancer comme le cancer du pancréas, du côlon ou du sein, ladite utilisation étant comprise dans l'invention.

L'invention concerne également une méthode de détection et/ou de dosage de la protéine OZF dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps monoclonal selon l'invention ; et
- b) la détection et/ou le dosage de la fixation dudit anticorps sur la protéine OZF contenue dans l'échantillon biologique.

Par ailleurs, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention, peuvent également être utilisés pour l'identification, la localisation, notamment tissulaire ou cellulaire, et/ou le dosage de la protéine OZF, ladite utilisation étant comprise dans l'invention.

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention constituent également un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression de la protéine OZF sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, par marquage enzymatique, radioactif ou à l'or. Ils permettent notamment de mettre en évidence et de quantifier la présence spécifique normale ou anormale de la protéine OZF dans les tissus ou prélèvements biologiques, ce qui les rend utiles pour l'identification et la localisation de l'expression de la protéine OZF, pour le diagnostic de pathologies liées à la présence anormale de la protéine OZF mais également pour le suivi de l'évolution de méthodes de prévention ou de traitement de pathologie nécessitant ladite détection ou ledit dosage.

Plus généralement, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où

l'expression de la protéine OZF doit être observée de manière qualitative et/ou quantitative.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué par un fluide biologique, tel que le sérum, le sang total, des cellules, un échantillon de tissu ou des biopsies d'origine humaine.

Toute procédure ou test classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection et/ou dosage. Ledit test peut être un test par compétition ou par sandwich, ou tout test connu de l'homme de l'art dépendant de la formation d'un complexe immun anticorps-antigène. Suivant les applications selon l'invention, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments peut être immobilisé ou marqué. Cette immobilisation peut être réalisée sur de nombreux supports connus de l'homme de l'art. Ces supports peuvent notamment inclure le verre, le polystyrène, le polypropylène, le polyéthylène, le dextran, le nylon, ou des celluloses naturelles ou modifiées. Ces supports peuvent être soit solubles ou insolubles.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologique (RIA) ou équivalent.

L'invention comprend également une trousse pour la détermination de la présence de protéine OZF dans un échantillon biologique comprenant un anticorps ou un de ses fragments selon l'invention.

Entre également dans le cadre de l'invention, une trousse pour la détection et/ou le dosage de la protéine OZF selon l'invention dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention ;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

Sous un dernier aspect, l'invention a pour objet une méthode pour évaluer l'affinité d'un composé à tester pour la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon contenant ladite protéine OZF avec
  - i) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention ; et
  - ii) ledit composé à tester ; et

- b) la mesure de la quantité dudit anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments, ladite quantité étant inversement proportionnelle à la quantité de composés à tester fixés sur ladite protéine OZF.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention ou leurs fragments peuvent être  
5 utilisés également dans des méthodes *in vitro* pour la sélection de composés susceptibles de se fixer à la protéine OZF avec l'affinité recherchée. Ainsi, la présente invention comprend également des méthodes de sélection par compétition de composés pharmaceutiques dans lesquelles les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments entrent en compétition avec le composé à tester susceptible de se  
10 fixer à la protéine OZF. De cette manière, l'anticorps monoclonal ou ses fragments est utilisé pour détecter la présence de tout composé tel qu'un polypeptide ou tout autre composé organique qui peuvent présenter un ou plusieurs sites de reconnaissance de l'épitope de la protéine OZF reconnu par les anticorps selon l'invention. Ainsi ces composés, identifiés par la méthode selon l'invention pourront être utilisés pour  
15 occuper ces sites de fixation sur la protéine OZF et agir en tant qu'agent modulateur ou antagoniste de l'activité biologique de la protéine OZF.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

20

#### LEGENDES DES FIGURES

**FIGURES 1A et 1B.** Analyse par Southern blot de lignées cellulaires pancréatiques et de tumeurs primaires.

Figure 1A : Hybridation par Southern blot des ADN totaux génomiques de placenta et  
25 de douze lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques digérés par BglII. Trois lignées cellulaires, AICPC-1, BxPC-3, Su.86.86 présentent une co-amplification d'OZF avec RAC. PANC-1 présente une amplification de RAC uniquement.

Figure 1B : Hybridation par Southern blot de l'ADN total génomique de AICPC-1 (figure 1A), de placenta (P) et de douze tumeurs primaires d'adénocarcinomes pancréatiques  
30 digérées par BglII. La comparaison des intensités des signaux d'hybridation d'OZF avec ceux obtenus après réhybridation avec une sonde N-myc montre une augmentation du nombre de copies du gène dans les échantillons tumoraux T6 et T9.

**FIGURE 2.** Expression de l'ARNm d'OZF dans les lignées cellulaires pancréatiques. L'ARN, des douze lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques analysées par  
35 Southern blot dans les figures 1A et 1B, était analysé par Northern blot avec une sonde

d'ADNc contenant la phase ouverte de lecture d'OZF. AICPC-1, BxPC-3, Su.86.86 ayant OZF amplifié, présentent un haut niveau d'expression. De hauts niveaux d'expression d'OZF sont observés en absence d'amplification dans Capan-1, -2, MIA PaCa-2 et PANC-1. L'absence ou une très faible expression a été observée dans un échantillon de pancréas normal adulte (Clontech). Le gel correspondant, coloré avant transfert au bromure d'éthidium, est montré en dessous, avec les bandes d'ARN ribosomiques 28S et 18S.

**FIGURES 3A, 3B et 3C.** Analyse par Western blot de lignées cellulaires pancréatiques et de tumeurs primaires. Des quantités identiques de protéine (10 µg), déterminées par coloration des extraits après électrophorèse sur gel SDS (non montré) ont été transférées sur nitrocellulose. La nitrocellulose a été alors bloquée et hybridée avec un anticorps polyclonal anti-OZF.

Figure 3A : Lignées cellulaires pancréatiques précédemment analysées par Southern et Northern blot (figure 1A et figure 2).

Figure 3B : Immunotransfert d'OZF d'échantillons de tumeurs primaires d'adénocarcinomes pancréatiques.

Figure 3C : Immunotransfert d'OZF de pancréas normal humain. Les protéines ont été extraites dans les mêmes conditions pour les quatre échantillons indépendants de pancréas normaux (P1-P4), la lignée MIA PaCa-1 (MP) et pour un carcinome pancréatique (T6) exprimant OZF. La nitrocellulose a été hybridée avec des anticorps polyclonaux anti-OZF et anti-pag afin de vérifier l'intégrité des protéines. Les anticorps anti-pag sont des anticorps de poule purifiés dans les mêmes conditions que les anti-OZF.

**FIGURES 4A, 4B et 4C.** Détection par immunohistochimie d'OZF dans les carcinomes pancréatiques humains. La coloration à la peroxydase a été obtenue avec un anticorps anti-OZF purifié par affinité. Les anticorps anti-OZF montrent une coloration granulaire nucléaire dans les cellules AICPC-1 greffées chez la souris athymique (figure 4A), dans un adénocarcinome exprimant OZF (figure 4B), et l'absence de coloration dans du pancréas sain n'exprimant pas OZF (figure 4C) (grossissement : 1000X).

**FIGURE 5.** Analyse par Western blot d'extraits bruts de cellules humaines 293 non transfectées et transfectées par un vecteur d'expression OZF. Détection de la protéine OZF endogène (à gauche) et après détection transitoire par un vecteur d'expression du gène OZF (à droite) en triplicate, avec un anticorps monoclonal anti-OZF et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase, par chimio-luminescence.

**FIGURE 6.** Marquage immunocytochimique de la protéine OZF dans les cellules de la lignée AICPC-1 issue d'un adénocarcinome pancréatique surexprimant la protéine OZF. Les cellules sont cultivées sur lamelle, fixées par 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS, puis perméabilisées par 0,1 % de triton X100. Les sites non spécifiques sont saturés par 2 % de BSA. Les cellules sont incubées 1 h avec l'anticorps monoclonal anti-OZF (1/200), lavées puis mises en contact 30 mn avec le second anticorps anti-souris couplé à un fluorochrome, lavées et incubées 4 mn au DAPI (0,2 µg/ml) qui marque spécifiquement les noyaux (photos de gauche). Un marquage nucléaire spécifique d'OZF est observé (photos de droite). A faible grossissement en haut et à fort grossissement en bas.

**FIGURE 7.** Expression du gène OZF dans les cancers du côlon. Analyse par Western blot.

A l'aide des anticorps monoclonaux, nous avons examiné l'expression de la protéine OZF dans les cancers du côlon. L'étude a porté sur 16 échantillons coliques. Sur les 16 échantillons, 10 proviennent d'une tumeur colique (T1 - T3 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10 - T11 - T12), et 6 de muqueuses coliques saines (C2 - C4 - C5 - C6 - C8 - C12). Les échantillons T5 et C5 proviennent d'un même patient, de même que T6 - C6, T8 - C8, et T12 - C12. Nous avons déposé dans les puits d'électrophorèse des quantités équivalentes de protéine pour chaque échantillon colique, les échantillons sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF. La protéine OZF est révélée par l'anticorps monoclonal anti-OZF et un anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase.

Dans les quatre cas où nous avons un échantillon colique sain et un échantillon colique cancéreux prélevés chez une même personne, nous avons constaté une accumulation plus importante de la protéine OZF dans le tissu tumoral que dans le tissu normal.

En comparant la quantité de protéine OZF accumulée, nous constatons que les tissus tumoraux T1 - T3 - T5 - T7 - T8 - T9 - T10 - T12 présentent une quantité supérieure de protéine OZF par rapport aux tissus sains.

**FIGURE 8.** Comparaison des séquences d'acides aminés N-terminales des protéines OZF suivant leur origine et leur réactivité avec les anticorps monoclonaux.

Comparaison de la région N-terminale de deux allèles de la protéine OZF humaine (hu-OZF) qui diffèrent par un polymorphisme à la position 8 (K/R) avec la protéine OZF d'origine murine (mu-OZF) et bovine (bo-OZF). La séquence du peptide synthétique utilisé dans les expériences d'inhibition compétitive est indiquée au-dessus (PEPTIDE).

Le résidu tyrosine en position 10 est souligné. La séquence de la protéine porteuse MBP est indiquée en petites lettres majuscules pour la protéine MBP-OZF. Le chaînon consensus H/C ("H/C link") précédant le premier doigt de zinc correspond à la position 11-17.

5 \* indique les positions parfaitement conservées ;

° indique le polymorphisme K/R.

La réactivité avec l'anticorps monoclonal 5B8 selon l'invention est indiquée dans la colonne de droite (+ : positive ; - : négative).

## 10 EXEMPLES

### Matériels et méthodes

Echantillons tumoraux et lignées cellulaires. Onze lignées de cellules d'adénocarcinomes de pancréas ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Rockville, USA) et cultivées comme prescrit par le fournisseur. Une lignée  
15 cellulaire additionnelle (AICPC-1) a été établie au laboratoire à partir de la tumeur primitive d'une patiente âgée de soixante ans atteint d'un adénocarcinome du pancréas. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dubelcco modifié supplémenté avec 20 % (vol/vol) de sérum de veau foetal. Des tissus tumoraux ont aussi été obtenus de patients atteints de carcinome primaire du pancréas exocrine (n = 13 ; 6  
20 hommes et 7 femmes).

Analyse par Southern et par Northern blot. L'extraction d'ADN a été effectuée suivant les méthodes standards pour les lignées cellulaires et pour les tumeurs congelées (Sambrook et al., 1989). Les fragments obtenus après digestion de l'ADN génomique (5 µg) avec l'endonuclease BglI ont été séparés par électrophorèse sur gel  
25 d'agarose à 0,7 %, transférés sur nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell) et hybridés avec des sondes marquées au P32 (Le Chalony et al., 1996). Les lignées de cellules tumorales ont été hybridées avec une sonde OZF obtenue après amplification par PCR à l'aide d'amorces internes pour générer un fragment de 1 kb contenant toute la phase ouverte de lecture (847-1840). Les carcinomes pancréatiques primaires ont  
30 été hybridés avec un fragment cloné XbaI/Scal (652-1852) (Le Chalony et al., 1994). La sonde RAC (2,2 kb) a été préparée à partir d'un clone pUC-RAC à l'aide d'amorces universelles situées de part et d'autre du site multiple de clonage (Cheng et al., 1992). L'évaluation quantitative des signaux d'hybridation a été faite au phosphorimager (BioRad). Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Rneasy (Qiagen). Pour les  
35 analyses en Northern blot, 10 µg d'ARN ont été déposés sur gel d'agarose 1 % / 2,2 M

formaldéhyde, transférés après migration sur membrane de nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell) et hybridés avec la sonde XbaI/Scal.

**Production des anticorps polyclonaux.** Les antisérums ont été développés chez la poule en utilisant la protéine OZF purifiée comme immunogène (Ferbus et al., 1996).

5 Les immunoglobulines IgY de jaune d'oeuf de poule ont été préparés comme décrit (Akita et al., 1992). Les anticorps spécifiques ont été obtenus à partir des IgY anti-OZF après purification par affinité sur une colonne de MBP-OZF couplé au sépharose 4B (Pharmacia) (Ferbus et al., 1996). La spécificité des anticorps anti-OZF a été vérifiée par immunoélectrophorèse. Une bande unique de 33 kDa a été observée dans les  
10 extraits nucléaires des cellules exprimant OZF.

**Méthode de préparation de l'anticorps monoclonal.** La protéine recombinante de fusion MBP-OZF produite chez E. coli a été purifiée sur colonne d'amylose par affinité pour le MBP (Ferbus et al., 1996). Des souris ont été immunisées avec la protéine MBP-OZF purifiée. L'immunisation de souris Balb/c est réalisée par trois injections  
15 sous-cutanées à deux semaines d'intervalle de 50 µg de protéine MBP-OZF purifiée. La réponse immune anti-OZF est contrôlée par ELISA et immunoblot en utilisant la protéine MBP-OZF. Trois jours avant la fusion, 100 µg de protéine MBP-OZF sont injectés par voie intraveineuse aux souris ayant les plus hauts titres d'anti-sérum. Après le test de criblage en ELISA, nous avons sélectionné pour l'étape de fusion la  
20 souris qui présentait la meilleure réponse. Les leucocytes spléniques ont été fusionnés avec les cellules de la lignée myélomateuse P3X63/8.653 en présence de polyéthylèneglycol à 50 %. Après "HAT" sélection dans la culture brute, les hybridomes sont encapsulés individuellement dans des gouttelettes d'agarose biotinylé et marqués par la protéine MBP-OZF conjuguée à l'isothiocyanate de fluoresceine (+) et par la  
25 protéine MBP-PAG conjuguée à la phycoérythrine (-). La suspension de gouttelettes est ensuite analysée par cytométrie de flux et seuls les hybridomes réagissant avec le conjugué MBP-OZF sont isolés et clonés suivant la technique de "sécrétion capture report web" (SCRW) (Kenney et al., 1995).

Les anticorps monoclonaux sont purifiés à partir du surnageant de culture des  
30 hybridomes par chromatographie d'affinité sur colonne protéine G Sépharose (Pharmacia).

Les immunoglobulines produites sont en majorité des IgG1.

L'anticorps monoclonal spécifique de la protéine OZF humaine reconnaît celle-ci à l'état natif ou dénaturé (en ELISA, en Western, en immunohistochimie, par  
35 immuno-précipitation).



**Technique ELISA pour la sélection et la caractérisation des anticorps monoclonaux.**

- Incubation de microplaques 96 puits pour ELISA en présence de 50 µl par puits d'une solution de MBP-OZF ou MBP-PAG (témoin) à 10 µg/ml en tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M, pH 9,6, une nuit à 4°C.
- Saturation avec une solution d'albumine bovine sérique à 2 % en tampon phosphate salin pH 7,3 (PBS).
- Addition de 25 µl de surnageant brut de culture de l'hybridome avec 25 µl d'une solution de Tween à 0,1 % en tampon PBS et incubation 2 heures à 37°C.
- Après lavage, addition de 50 µl d'une solution au 1/10 000 d'anticorps de chèvre anti-souris conjugués à la phosphatase alcaline (Sigma, St Louis, MO) et incubation 1 heure à 37°C.
- Détection avec une solution de p-nitrophényl phosphate à 1 mg/ml en tampon diéthanolamine, pH 9,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM.
- Mesure de l'absorbance à 405 nm avec un lecteur microplaque (Titertek Multiscan de chez Labsystem, les Ulis, France).

Les isotypes des anticorps monoclonaux sont déterminés par ELISA en utilisant un kit pour le sous-typage d'hybridome murin (Boehringer-Mannheim, Allemagne).

L'épitope de reconnaissance se situe au niveau de son extrémité NH<sub>2</sub> terminale. Il reconnaît en effet la protéine OZF recombinante tronquée, ne possédant que les deux premiers doigts à zinc, et ne reconnaît pas la protéine murine homologue qui diffère de la protéine humaine au niveau de ses quinze premiers acides aminés.

**Extraction des protéines et analyse par Western blot avec anticorps polyclonaux.**

Les échantillons tumoraux congelés et les extraits cellulaires ont été solubilisés dans du tampon SDS en présence de β-mercaptoéthanol et chauffés à ébullition 5 minutes. Des quantités égales de protéines (10 µg) ont été chargées sur gel SDS polyacrylamide 12 % et transférées après migration sur membrane de PDVF (Amersham). Les membranes ont été hybridées avec les anticorps anti-OZF puis avec des anti-poules de lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Sigma), dilués respectivement 200 et 15 000 fois. La chimioluminescence a été produite par incubation de la membrane avec du CDP star (Dupont) et la protéine a été révélée par autoradiographie sur un film X-OMAT AR5.

**Extraction des protéines et analyse par Western blot avec anticorps monoclonaux.** Les cellules sont cultivées à confluence, trypsinées, concentrées par centrifugation et lysées avec du tampon (65 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,01 % bleu de

bromophénol, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 10 % glycérol, 2 % SDS) en présence d'inhibiteurs de protéase, chauffées à ébullition puis soniquées. 50  $\mu$ g d'extrait cellulaire ou 0,05  $\mu$ g de protéine recombinante sont chargés dans chaque puits. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel polyacrylamide à 12 % en SDS et transférées sur membrane PDVF (Immobilon-P, Millipore). L'efficacité du transfert de protéine est contrôlée par coloration Ponceau S. L'analyse par Western blot est réalisée selon la technique décrite dans Ferbus et al., 1996. Les blots sont hybridés pendant 2 heures avec des anticorps anti-OZF dilués au 1/500 puis avec des IgG anti-souris de chèvre conjugués à la phosphatase alcaline dilués au 1/10 000. Les mêmes conditions sont utilisées pour le témoin positif avec des anticorps anti-OZF de poulet dilués au 1/200 et des anticorps anti-poulet IgY de lapin au 1/10 000. La phosphatase alcaline est détectée par chimioluminescence avec le réactif CDP-star (NEN Live Science Products) et visualisée par autoradiographie (X-OMAT AR, Kodak, Rochester, NY).

**Immunofluorescence.** Les cellules sont cultivées dans des lames Lab-Teck à chambre (Nunc Inc., Naperville, IL) pendant 24 heures. Les lames Lab-Teck sont lavées deux fois en PBS et fixées avec une solution à 4 % de paraformaldéhyde en PBS (p/v) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées en PBS et incubées deux fois pendant 30 minutes dans une solution à 0,1 M glycine, 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 puis perméabilisées dans une solution de triton X100 à 0,1 % (v/v) dans du PBS pendant 5 minutes. Les anticorps anti-OZF purifiés sont incubés pendant une heure à 37°C (dilution au 1/100) en tampon PBS à 0,5 % d'albumine bovine sérique (p/v). Après lavage, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C avec des anticorps IgG (H+L) anti-souris de chèvre conjugués à la FITC (isothiocyanate de fluoréscéine) dilués au 1/80 (Biosys S.A., France). Les lames sont colorées par contraste avec du DAPI (4'6-diamidino-2-phénylindole) pour la coloration de l'ADN de la chromatine, fixées par une solution (Vectashield, Vector Laboratoires, Inc., Burlingame, CA) et observées sous un microscope à fluorescence.

**Marquage immunohistochimique d'OZF.** La coloration a été obtenue par un anti-poule couplé à la peroxydase après incubation avec un antisérum anti-OZF de poule purifié, sur des coupes de tissu congelé (5  $\mu$ m) comme décrit (Terris et al., 1995).

**Transfection des cellules NIH3T3.** La surexpression d'OZF est réalisée par transfection d'une lignée cellulaire murine NIH3T3 avec un vecteur plasmidique exprimant la protéine OZF dans des cellules eucaryotes. Le milieu de culture estensemencé avec une densité cellulaire de  $0,8 \times 10^6$  cellules dans des boîtes de pétri

de diamètre 60 mm puis les cellules sont transfectées 24 h plus tard avec 2 µg de plasmide en utilisant la technique de calcium-phosphate. 5 à 6 h après la transfection les précipités sont éliminés et les cellules sont remises en milieu de culture. Le jour suivant, les cellules sont transférées dans des lames Lab-Tek à chambre et fixées avant l'analyse par immunofluorescence.

**EXEMPLE 1 : Amplification du gène OZF dans les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques**

Pour évaluer le nombre de copies du gène OZF dans les cellules des lignées tumorales et déterminer s'il appartient à l'amplicon portant le gène RAC, les ADN génomiques totaux, de 12 lignées cellulaires et d'un placenta, ont été digérés avec l'enzyme de restriction BglII, séparés sur gel d'agarose et hybridés par Southern blot avec des sondes ADN OZF et RAC. Comme montré dans la figure 1A, trois lignées, AICPC-1, BxPC-3, SU.86.86 présentent un signal d'amplification dans un fragment génomique BglII de taille de 5,3 kb. La quantification des niveaux d'amplification révèle que le gène OZF est approximativement de 60 copies, 6 copies et 30 copies dans AICPC-1, BxPC-3, SU.86.86 respectivement. La co-amplification avec RAC est observée dans ces trois lignées, cependant PANC-1 montre une amplification de RAC seule. Le nombre de copies des gènes RAC et OZF est similaire dans BxPC-3. L'intensité relative du signal d'amplification est supérieure pour le gène OZF que pour RAC dans AICPC-1 et inférieure dans SU.86.86. Ces expériences montrent que le gène OZF est co-amplifié avec RAC dans trois des quatre lignées cellulaires. Contrairement à ce qui avait été reporté, l'amplification de RAC dans la lignée AsPC-1 n'est pas détectée (Cheng et al., 1996 ; Miwa et al., 1996). Les analyses caryotypiques des lignées cellulaires ont confirmé la ploïdie et la spécificité du marquage chromosomique de chaque lignée incluant AsPC-1 (Curtis et al., à paraître). L'amplification précédemment décrite dans AsPC-1 peut être due à un sous clone ou avoir été perdue pendant la propagation en culture.

L'état d'amplification d'OZF a été examiné dans des échantillons tumoraux. Douze adénocarcinomes primaires pancréatiques, pris au hasard, ont été analysés par Southern blot avec une sonde OZF (figure 1B). Deux tumeurs (T6 et T9) présentent une augmentation du signal d'hybridation (de 3 à 5 fois) par rapport à l'ADN placentaire, après normalisation avec le signal obtenu après réhybridation avec une copie unique du gène N-myc. Ce signal est considéré comme significatif pour

l'amplification étant donné la forte proportion de cellules non tumorales dans les tissus tumoraux.

**EXEMPLE 2 : Expression d'OZF dans les lignées pancréatiques et dans les échantillons tumoraux**

5 L'expression d'OZF a été examinée en premier dans les lignées tumorales par Northern blot (figure 2). Différents niveaux d'expression ont été détectés dans toutes les lignées. Les lignées AICPC-1 et SU.86.86 qui présentent les plus hauts niveaux d'amplification expriment les plus hauts niveaux de mRNA OZF. Une expression modérée est observée dans BxPC-3, Capan-1, Capan-2, MIAPaCa-2 et PANC-1, et  
10 une plus faible expression est trouvée dans les quatre lignées restantes.

L'expression d'OZF a été aussi recherchée au niveau protéique par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine OZF recombinante exprimée chez E.coli (Ferbus et al., 1996). La protéine OZF a été détectée dans toutes les lignées cellulaires (figure 3A). Le plus haut niveau de la protéine est trouvé dans les  
15 lignées cellulaires qui présentent une amplification du gène OZF (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). Comme le tissu pancréatique présente des ARN souvent dégradés, l'expression d'OZF a été étudiée dans les tumeurs et le pancréas normal par la détermination de l'accumulation de sa protéine. Afin de comparer le taux de la protéine OZF dans le pancréas normal adulte avec ceux trouvés dans les tumeurs, les  
20 protéines de quatre échantillons pancréatiques différents ont été extraites selon le protocole standard et analysées par Western blot (figure 3C). L'intégrité des extraits a été contrôlée par l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ubiquitaire PAG de 22 kDa qui est exprimée dans les cellules en prolifération (Prospéri et al., 1993). Parmi les huit échantillons d'adénomes pancréatiques primaires étudiés,  
25 trois présentent un faible niveau de la protéine OZF comme dans les échantillons de pancréas sains. Cinq tumeurs (T6-T9, T12) présentent les plus hauts niveaux d'OZF (figures 3B et 3C). Par conséquent le gène OZF est exprimé à hauts niveaux dans plus de la moitié des adénocarcinomes analysés.

**EXEMPLE 3 : Restriction de l'expression d'OZF aux cellules tumorales dans les tumeurs pancréatiques**

30 L'utilisation possible d'anticorps anti-OZF dans des études immunohistochimiques a été déterminée. L'expression d'OZF a été détectée (figure 4A) dans une tumeur obtenue après greffe des cellules AICPC-1 chez la souris athymique. L'immunohistochimie a été effectuée sur des coupes de carcinomes pancréatiques  
35 congelés afin de déterminer si d'autres types cellulaires en plus des cellules tumorales,

contribuent à l'expression d'OZF. Un exemple de carcinome pancréatique montrant une expression d'OZF est montré en figure 4B. Les anticorps anti-OZF révèlent par coloration une granulation nucléaire qui prédomine dans les cellules tumorales. Les autres types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales présentent une très faible ou une absence de coloration. Ainsi dans les tumeurs pancréatiques l'expression d'OZF est restreinte principalement aux cellules tumorales et les anticorps anti-OZF peuvent être utilisés pour détecter les cellules tumorales dans des tumeurs pancréatiques hétérogènes.

**EXEMPLE 4 : Expression du gène OZF dans les cancers du côlon**

A l'aide des anticorps monoclonaux, l'expression de la protéine OZF a été examinée dans les cancers du côlon. L'étude a porté sur 16 échantillons coliques. Sur les 16 échantillons, 10 proviennent d'une tumeur colique (T1 - T3 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10 - T11 - T12), et 6 de muqueuses coliques saines (C2 - C4 - C5 - C6 - C8 - C12). Les échantillons T5 et C5 proviennent d'un même patient, de même que T6 - C6, T8 - C8, et T12 - C12.

**Analyse par Western blot :**

Des quantités équivalentes de protéine pour chaque échantillon colique sont déposées dans les puits d'électrophorèse. Les échantillons sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF. La protéine OZF est révélée par l'anticorps monoclonal anti-OZF et un anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase. Le résultat est présenté figure 7.

Dans les quatre cas où l'échantillon colique sain et l'échantillon colique cancéreux sont prélevés chez une même personne, une accumulation plus importante de la protéine OZF est constatée dans le tissu tumoral que dans le tissu normal.

En comparant la quantité de protéine OZF accumulée, on constate que les tissus tumoraux T1 - T3 - T5 - T7 - T8 - T9 - T10 - T12 présentent une quantité supérieure de protéine OZF par rapport aux tissus sains.

D'après les résultats, 50 % des tissus cancéreux analysés présentent une forte surexpression d'OZF et 80 % des échantillons tumoraux analysés ont un niveau d'expression de la protéine OZF supérieur à celui observé dans les tissus normaux. Ces observations montrent que le gène OZF est surexprimé dans les cancers du côlon.

Les résultats obtenus dans les exemples précédents montrent que l'amplification du gène OZF a été observée dans 3 des 12 lignées d'adénocarcinomes

du pancréas (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). L'augmentation du nombre de copies du gène a été aussi trouvée dans 2 des 12 échantillons de tumeurs primaires (T6 et T9), quoiqu'à des niveaux plus faibles que ceux observés dans les lignées. Parce que les tumeurs primaires pancréatiques contiennent généralement un large excès de cellules normales, l'hybridation du signal en Southern blot peut avoir été atténuée dans les tumeurs T6 et T9. De plus, les échantillons contenant peu de cellules tumorales, présentant un signal d'amplification modéré, échappent à la détection. Les xénogreffes sur souris athymiques devraient nous permettre une meilleure estimation de l'amplification du gène OZF dans les tumeurs pancréatiques primaires. En addition à ces résultats, l'amplification d'OZF a été identifiée par hybridation in situ en fluorescence dans la tumeur utilisée pour générer la lignée AICPC-1 (Curtis et al., à paraître). Ainsi, l'amplification d'OZF a lieu dans les tumeurs pancréatiques primaires et dans les lignée cellulaires.

Toutes les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques expriment l'ARNm et la protéine OZF mais à des niveaux différents. Les plus hauts niveaux d'ARNm d'OZF ont été trouvés dans les lignées ayant amplifié le gène OZF (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). Quoique l'estimation de la protéine peut être moins précise, le taux de la protéine OZF a été comparé dans les deux tumeurs primaires présentant une amplification du nombre de copies (T6 et T9), à la lignée cellulaire MIAPaCa-2. Les deux tumeurs expriment de hauts niveaux de protéines OZF. Ainsi, le gène OZF qui est hautement exprimé dans toutes les tumeurs pancréatiques présentant une amplification, n'est pas inactivé dans l'amplicon 19q13.1.

L'amplification génique est un mécanisme important pour l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la cancérogenèse même si la surexpression est souvent observée en absence d'amplification. Les études d'expression de quatre échantillons indépendants de pancréas normaux et de trois échantillons de tumeurs primaires montrent des niveaux de protéines OZF très faibles ou indécélables. Au contraire, toutes les lignées expriment OZF et quatre d'entre elles montrent de hauts niveaux d'ARNm OZF en absence d'amplification. Le cas le plus significatif est celui de la lignée PANC-1 qui possède deux copies du gène OZF et exprime un haut niveau d'ARNm de 2 à 4 fois plus bas que celui de la lignée SU.86.86 qui possède 30 copies du gène OZF. De hauts niveaux de protéine OZF sont aussi observés dans des tumeurs primaires sans amplification du gène OZF, et l'immunohistochimie montre que la protéine OZF est détectée essentiellement dans les cellules tumorales. En dehors du statut d'amplification génique, OZF est surexprimé dans 7 des 12 lignées tumorales

et dans 5 des 8 tumeurs primaires. Les plus hauts niveaux d'expression d'OZF dans un large échantillon de tumeurs comparé au pancréas normal suggèrent que ce gène est impliqué dans le processus oncogénique. De plus il pourrait être utilisé comme un marqueur pour détecter de rares cellules tumorales dans le pancréas.

5 En dehors du gène OZF, la région q13.1 du chromosome 19 comprend  
plusieurs gènes candidats. Le mieux caractérisé est le gène RAC, localisé à proximité  
d'OZF, qui code pour une sérine-thréonine kinase (The Human Gene Map, 1997). Les  
deux gènes sont coamplifiés dans les lignées cellulaires, cependant seul le gène RAC  
a été trouvé amplifié dans PANC-1. Cependant, dans la lignée PANC-1, dans laquelle  
10 le gène RAC est amplifié, les niveaux d'ARNm sont seulement légèrement plus bas  
que ceux observés dans les lignées cellulaires qui présentent une amplification du  
gène OZF. Cette lignée cellulaire contient aussi une protéine OZF abondante. Ainsi, la  
surexpression d'OZF dans PANC-1 peut être due à un mécanisme autre que  
l'amplification génique comme dans le cas d'autres gènes connus. Par exemple dans  
15 les cancers du sein et de l'ovaire, la prévalence de la surexpression HER2/neu  
intervient plus fréquemment que l'amplification et a été utilisée pour prédire le taux de  
survie (Slamon et al., 1989).

**EXEMPLE 5 : Sélection des hybridomes et caractérisation des anticorps**

### A. Sélection des hybridomes

Après immunisation puis fusion cellulaire les anticorps sécrétés par un seul hybridome sont examinés en utilisant la technique SCRW et sélectionnés une à une par cytométrie de flux. 22 sumageants réagissant par FACS (trieur automatique de cellules par cytométrie de flux par fluorescence) avec la protéine OZF recombinante et ne réagissant pas avec la protéine porteuse MBP sont testés pour leur activité avec la protéine recombinante MBP-OZF. La moitié des lignées cellulaires sont positives par ELISA et immunoblot (cf. tableau 1). Aucune réactivité n'est observée après ELISA sur la protéine MBP-PAG indiquant que ces sumageants sont spécifiques du polypeptide OZF (Prospéri M-T et al., 1993). Dans la mesure où certains anticorps monoclonaux peuvent réagir avec des épitopes résultant de la fusion avec la protéine porteuse MBP la réactivité des sumageants a été examinée avec la protéine OZF produite par des cellules eucaryotes. Après analyse par immunoblot et immunofluorescence en présence de protéines OZF endogènes issues de cellules mammaires humaines HBL

100, six anticorps monoclonaux ont été sélectionnés sur la base de leur forte réactivité avec la protéine OZF humaine (cf. tableau 1 ci-dessous).

**TABLEAU 1** : Criblage et sélection des anticorps monoclonaux anti-OZF.

5

LIGNEE CELLULAIRE	ELISA MBP-OZF	ELISA MBP-PAG	IMMUNOBLOT MBP-OZF	IMMUNOBLOT HBL100 CELLULES	IFA HBL100 CELLULES
4A5	+	-	+	-	-
5B1	-	-	-	-	-
5B8	+++	-	+++	+++	++
5B9	+	-	+	-	+
4C3	-	-	-	-	-
4C8	+	-	+	-	-
5C10	+++	-	+++	+++	+++
5C11	+++	-	-	-	+
5D9	+++	-	+++	-	++
5D10	+	-	-	-	-
5D11	+	-	-	-	-
5E9	++	-	++	+	+
5E10	+++	-	-	-	+
5F1	+	-	-	-	-
5F4	+	-	-	-	-
5F8	+	-	-	-	-
5G10	+++	-	+++	+++	+
5H2	-	-	-	-	-
5H4	+++	-	+++	-	-
5H7	+++	-	+++	+++	+++
5H8	+++	-	++	-	+
4H10	+++	-	+++	+++	+++

Légende du Tableau 1 : Les surnageants bruts de culture de 22 clones d'hybridomes sélectionnés par la technique SCRW ont été testés successivement par ELISA contre les protéines recombinantes MBP-OZF et MBP-PAG, puis ensuite par immunoblot et immunofluorescence (IFA) contre la protéine MBP-OZF et la protéine OZF endogène



issue de cellules HBL 100 humaines. La protéine recombinante MBP-PAG a été utilisée comme témoin négatif.

#### **B. Caractérisation des anticorps monoclonaux**

5       Après purification sur colonne protéine G Sépharose les sous-types d'immunoglobuline des six anticorps monoclonaux sélectionnés ont été déterminés. Cinq anticorps (5B8, 5C10, 5G10, 5H7, 4H10) appartiennent au sous-type IgG1 et un anticorps au sous-type IgG3 (5D9). Les anticorps monoclonaux ont également été testés par immunoblot et immunofluorescence avec différents extraits de cellules de  
10       mammifères. L'analyse par Western blot sur des extraits humains (cellules de sein, de rein, de côlon et de pancréas) détectent une bande unique de 33 kDA caractéristique de la protéine OZF. De manière inattendue, les anticorps monoclonaux ne reconnaissent pas les protéines OZF bovine et murine en dépit de leur forte identité (95 %) avec la protéine OZF humaine (Le Chalony, C. et al., 1996 ; Blottière L. et al.,  
15       1999). L'absence de réactivité ne résulte pas du processus de traduction dans la mesure où les protéines OZF murine traduites in vitro ne sont pas non plus détectées. Les mêmes résultats sont observés par immunofluorescence (cf. tableau 2 ci-dessous), une forte expression nucléaire d'OZF est observée après transfection des cellules murines NIH3T3 avec le vecteur d'expression. Aucune fluorescence n'est  
20       visible sur les cellules murines NIH3T3 non transfectées. Par conséquent, les six anticorps monoclonaux ainsi produits et caractérisés selon l'invention sont hautement spécifiques de la protéine humaine OZF.

#### **EXEMPLE 6 : Détermination de l'épitope**

25       Puisque les anticorps monoclonaux réagissent seulement avec la protéine OZF humaine, les séquences OZF humaines, bovine et murine ont été comparées afin de déterminer dans une première étape la localisation de l'épitope.

      La plupart des domaines variables sont situés dans les trois premiers doigts de zinc et dans la séquence du peptide leader (PL) de 10 acides aminés précédant le  
30       domaine doigt de zinc (Le Chalony et al., 1996 ; Blottière et al., 1999).

      Cette première étape suggère que la localisation de l'épitope est située de manière plausible dans la partie N-terminale de la protéine OZF. Compte tenu du fait que la protéine MBP-OZF pour laquelle les cinq premiers acides aminés de la protéine OZF sont manquants, réagit avec les anticorps monoclonaux selon l'invention, il est

fort probable que l'épitope contre lequel sont dirigés ces anticorps monoclonaux est situé à la jonction entre le peptide leader et le premier doigt de zinc (cf. figure 8).

Afin de confirmer cette hypothèse, une technique ELISA par inhibition compétitive est réalisée en présence d'un peptide dont la séquence correspond au  
5 fragment aa4-aa17 de la protéine OZF humaine. Ce peptide se révèle être un puissant inhibiteur compétitif vis-à-vis des anticorps monoclonaux selon l'invention (cf. tableau 2 ci-après).

TABLEAU 2 : Caractérisation des anticorps monoclonaux sélectionnés.

Méthode de détection	Antigène	Anticorps						
		Y-OZF	5B8	5C10	5D9	5G10	5H7	4H10
ELISA	anticorps monoclonal	IgY	Ig1	Ig1	Ig3	Ig1	Ig1	Ig1
	MBP-OZF	+	+	+	+	+	+	+
	MBP-OZF + compétition par peptide aa4 - aa17	+	-	-	-	-	-	-
Immunoblot	OZF humaine	+	+	+	+	+	+	+
	OZF bovine	+	-	-	-	-	-	-
	OZF murine	+	-	-	-	-	-	-
	OZF murine traduite in vitro	+	-	-	nf	nf	-	nf
Immunofluorescence	OZF humaine	+	+	+	+	+	+	+
	Cellules NIH3T3 murines	+	-	-	-	-	-	-
	Cellules NIH3T3 murines transfectées avec OZF humaine	+	+	+	+	+	+	+

Légende du tableau 2 : Six anticorps monoclonaux anti-OZF ont été testés par ELISA, immunoblot et immunofluorescence. Les anticorps monoclonaux et l'anticorps polyclonal de poulet anti-OZF ont été dilués respectivement au 1/500 et au 1/100. La compétition est réalisée en présence de 0,05 mg/ml du peptide synthétique aa4-aa17 (cf. figure 8).

Pour l'immunoblot, les extraits suivants ont été utilisés :

- origine humaine : cellules HBL100 du sein, cellules 293 de rein, cellules SU86-86 de pancréas, cellules RC8 et TC7 de côlon ;

- origine murine : fibroblastes NIH3T3 ;

- 10 - origine bovine : cellules FBHE d'endothélium et lymphocytes LB9THY.

L'immunofluorescence a été réalisée sur des lignées cellulaires HBL100 et NIH3T3.

L'anticorps polyclonal de poulet anti-OZF a été utilisé comme témoin positif (Y-OZF).

(+) : détection d'OZF ; (-) : pas de détection d'OZF ; nf : non fait.

15 Ces résultats démontrent que les six anticorps monoclonaux selon l'invention testés reconnaissent un épitope commun de la protéine OZF humaine situé à la jonction entre le peptide leader et le premier doigt de zinc. Dans cette région, la comparaison des séquences humaines et bovine de la protéine OZF met en évidence deux substitutions :

- 20 - une première substitution conservatrice en position 8 résultant d'un polymorphisme lysine/arginine chez l'homme qui ne modifie pas la réactivité des anticorps monoclonaux ; et

- la substitution d'un résidu tyrosine par un résidu leucine en position 10 dans la séquence bovine.

25 Dans la séquence de la protéine OZF murine, un résidu cystéine est trouvé en position 10 et deux substitutions en positions 13 et 14.

Par conséquent, ces résultats montrent que la présence d'un résidu tyrosine en position 10 est critique pour la reconnaissance des anticorps monoclonaux et influence de manière probable la conformation de cette région épitopique.

30 La comparaison de la séquence de cet épitope avec des séquences de protéines issues de banques de données n'a pas permis d'identifier d'autres protéines portant cet épitope.

Ainsi, six anticorps monoclonaux efficaces pour la détection de la protéine OZF recombinante et native par ELISA, western blot ou immunofluorescence ont ainsi été purifiés et caractérisés. Cinq anticorps sont de type IgG1 et un de type IgG3. Au

35

contraire, des anticorps polyclonaux qui détectent de nombreuses protéines à doigt de zinc autres que la protéine OZF humaine, ces anticorps monoclonaux selon l'invention reconnaissent un épitope unique de la protéine OZF humaine. La séquence de cet épitope unique situé à la jonction entre les dix premiers acides aminés et le domaine doigt de zinc n'est pas présent dans les autres protéines de Kruppel, incluant les

5 protéines OZF d'origine murine et bovine. Ces anticorps monoclonaux selon l'invention sont hautement spécifiques de la protéine endogène OZF humaine, à la fois sous sa forme dénaturée et native.

**Bibliographie**

- Akita, E.M. and Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification, *J. Food Sci.*, **57**: 629-634, 1992.
- 5 Blottière L. et al., *Cytogenet. Cell Genet.*, **85**: 297-300, 1999.
- Carter, et al. *PNAS* **89**: 4285-4289, 1992.
- Chaudry, et al. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9437-9441, 1993.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tschlis, P.N. and Testa, J. R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a
- 10 family of protein-serin/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9267-9271, 1992.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K. and Testa, J.R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:
- 15 3636-3641, 1996.
- Cozenza, et al. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 114, 1976.
- Ferbus, D., Le Chalony, C., Prosperi, M.T., Muleris, M., Vincent-Salomon, A. and Goubin, G. Identification, nuclear localisation, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs. *Europ. J. Biochem.*, **236**: 991-995, 1996.
- 20 Geysen, et al. *J. Immunol. Methods*, **102**: 259-274, 1978.
- Gilman, et al. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press, 1990.
- Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications pp. 726, 1988.
- 25 Hsieh-Ma, et al. *Cancer Res.*, **52**: 6832-6839, 1992.
- Kenney, et al. Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web. *Bio/technology*, **13**: 787-790, 1995.
- Kerr, et al. *J. Immun.*, **144**: 4060-4067, 1990.
- King, et al. *Biochemical J.*, **290**: 723-729, 1991.
- 30 K hler et Milstein. *Nature*, **256**: 495-497, 1975.
- Le Chalony, C., Prosperi, M.T., Haluza, R., Apiou, F., Dutrillaux, B. and Goubin, G. The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs. *J. Mol. Biol.*, **236**: 399-404, 1994.
- Le Chalony, C., Apiou, F., Pibouin, L., Dutrillaux, B. and Goubin G. Constitutive
- 35 amplification of a zinc finger protein gene in cattle. *DNA and Cell Biol.* **15**: 83-88, 1996.

- Miwa, W., Yasuda, J., Murakami, Y., Yashima, K., Sugano, K., Sekine, T., Kono, A., Egawa, S., Yamaguchi, K., Hayashizaki, Y. and Sekiya, T. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1 -q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **225**: 968-974, 1996.
- 5 Mountain, et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **10**: 1-142, 1992.
- Prospéri, M.T., Ferbus, D., Karczinski, I. and Goubin G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J. Biol. Chem.* **268**: 11050-11056, 1993.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., 1990.
- 10 Saha, et al. *J. Nucl. Med.* **6**: 542, 1976.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Singer, et al. *J. Immun.* **150**: 2844-2857, 1992.
- Selvaggi, et al. *J. Immuno-therapy*, **13**: 201-207, 1993.
- 15 Skerra et al. *Science*, **240**: 1038-1041, 1988.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**: 707-712, 1989.
- Sung, et al. *J. Cancer Res.* **53**: 2092-2099, 1993.
- 20 Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Fléjou, J.F., Hénin, D. and Dejean, A. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* **55**: 1590-1597, 1995.
- The Human Gene Map (1997) The National Center for Biotechnology Information, The National Institutes of Health, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/>.
- 25 Verhoeven, et al. *BioEssays*, **8**: 74, 1988.
- Wagner, et al. *J. Nucl. Med.*, **20**: 428, 1979.

## **REVENDECATIONS**

1/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments capable de se fixer spécifiquement sur un épitope de la protéine OZF.

5 2/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la revendication 1 caractérisé en ce que la protéine OZF est d'origine humaine.

3/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est situé sur la partie N-terminale.

10 4/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est situé sur la partie N-terminale comprenant le résidu tyrosine situé en position 10 de la séquence de la protéine OZF humaine.

5/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des  
15 revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est produit par une cellule telle que déposée à la CNCM le 6 Septembre 1999 sous le numéro I-2308.

6/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps humanisés, chimériques, anti-idiotypes.

20 7/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est marqué.

8/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est couplé à un composé cytotoxique.

9/ Cellule capable de produire un anticorps monoclonal selon l'une des  
25 revendications 1 à 5 telle que déposée à la CNCM le 6 Septembre 1999 sous le numéro I-2308.

10/ Composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 30 a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 6 et 8 ; et  
b) un excipient pharmaceutiquement acceptable.

11/ Composition pharmaceutique pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :



a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7 ; et

b) un excipient pharmaceutiquement acceptable.

5       **12/** Composition pharmaceutique selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que ladite pathologie est choisie parmi les cancers, notamment le cancer du pancréas, du côlon ou du sein.

10       **13/** Utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 6 et 8, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention du cancer, notamment le cancer du pancréas, le cancer du côlon ou le cancer du sein.

14/ Utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7, pour le diagnostic *in vitro* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF.

15       **15/** Méthode de détection et/ou de dosage de protéine OZF dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 1 à 7 ; et

b) la détection et/ou le dosage de la fixation dudit anticorps sur la protéine OZF contenue dans l'échantillon biologique.

20       **16/** Trousse pour la détermination de la présence de protéine OZF dans un échantillon biologique comprenant un anticorps ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7.

17/ Méthode d'évaluation de l'affinité d'un composé pour la protéine OZF caractérisée en ce qu'elle comprend :

25       a) la mise en contact d'un échantillon contenant ladite protéine OZF avec

i) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7 ; et

ii) ledit composé à tester ; et

30       b) la mesure de la quantité dudit anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments, ladite quantité étant inversement proportionnelle à la quantité de composés à tester fixés sur ladite protéine OZF.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/7

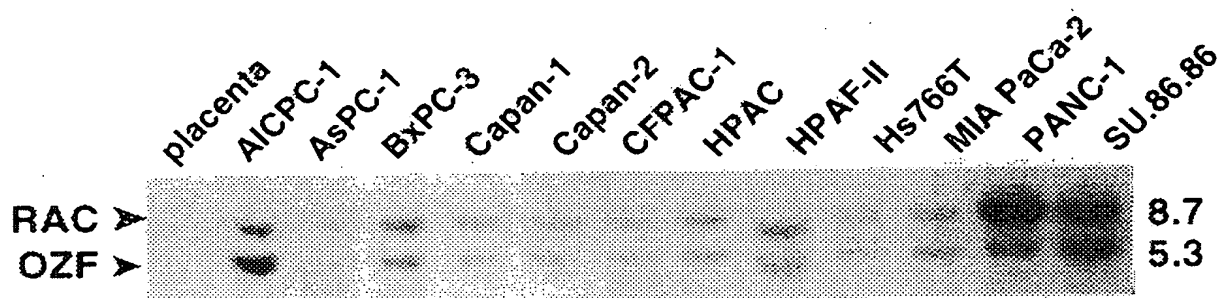


FIGURE 1A

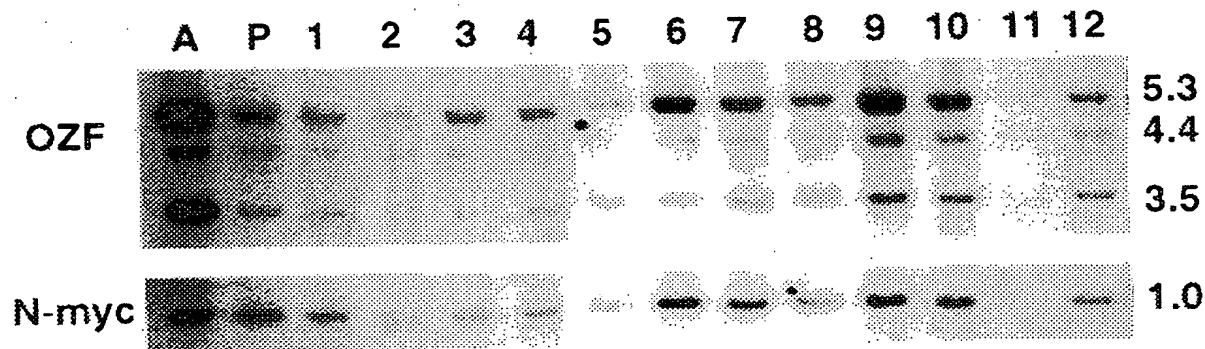


FIGURE 1B

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/7

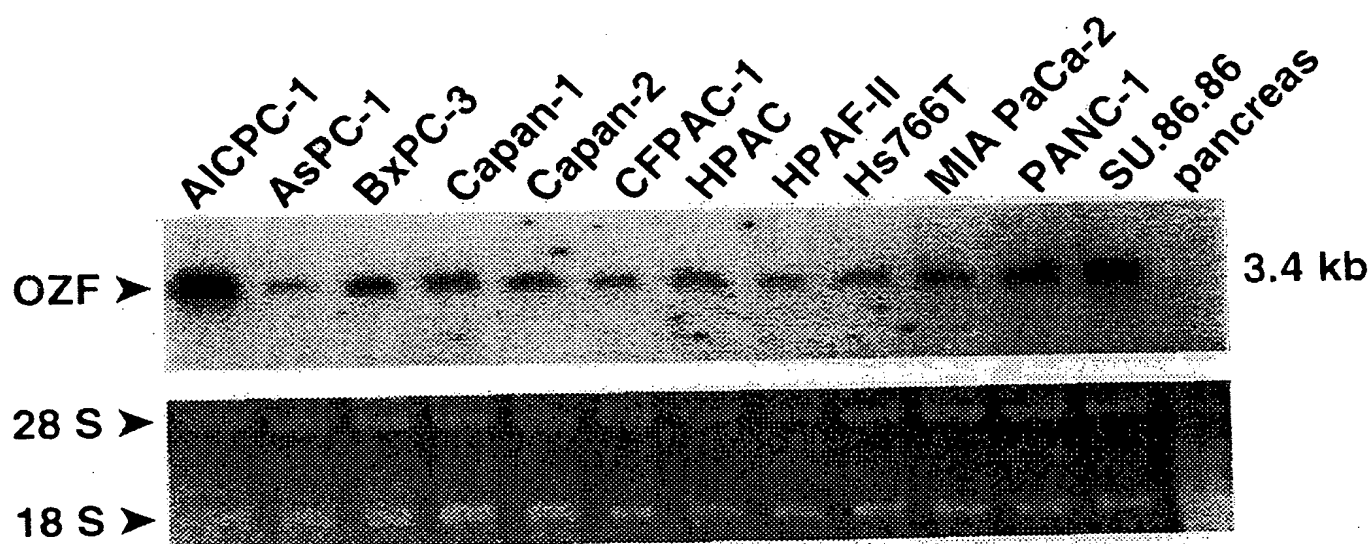


FIGURE 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/7

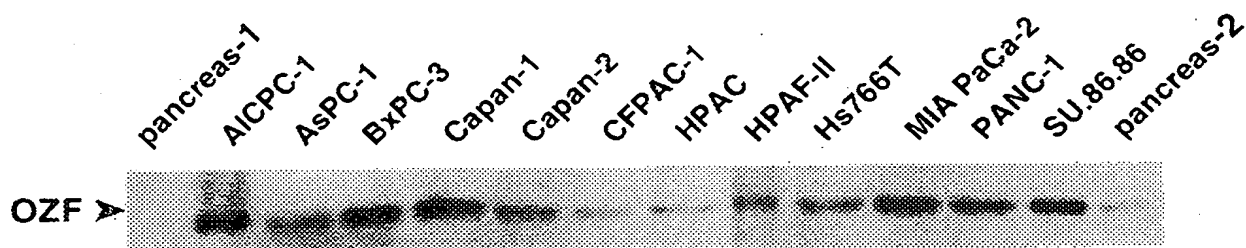


FIGURE 3A

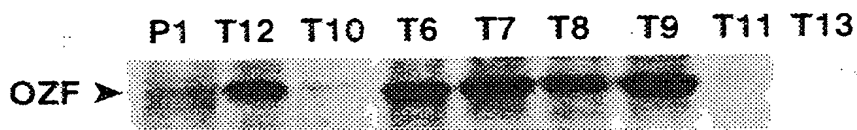


FIGURE 3B

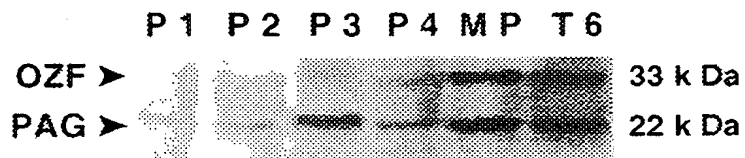


FIGURE 3C

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4/7

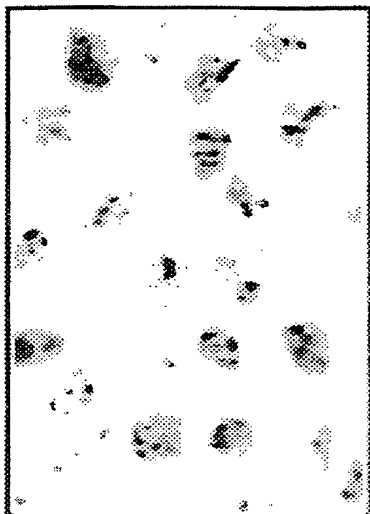


FIGURE 4A



FIGURE 4B

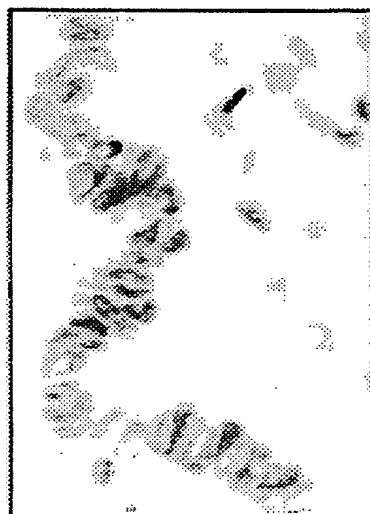


FIGURE 4C



FIGURE 5

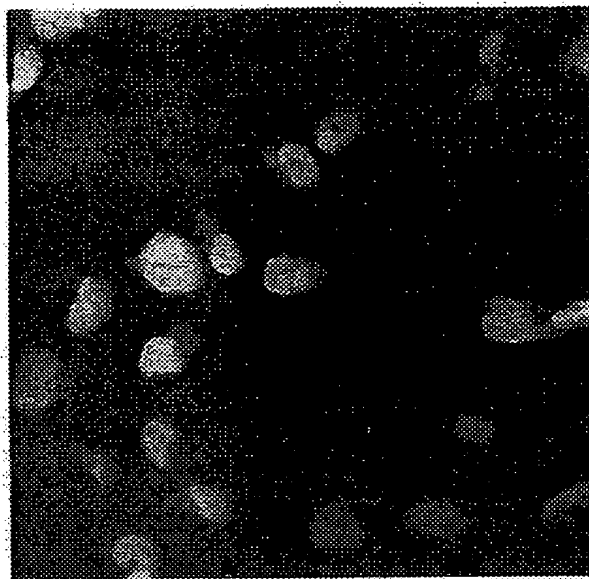
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

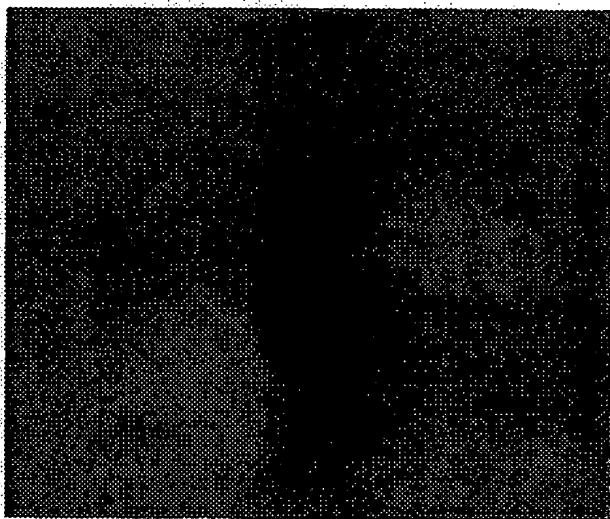
5/7



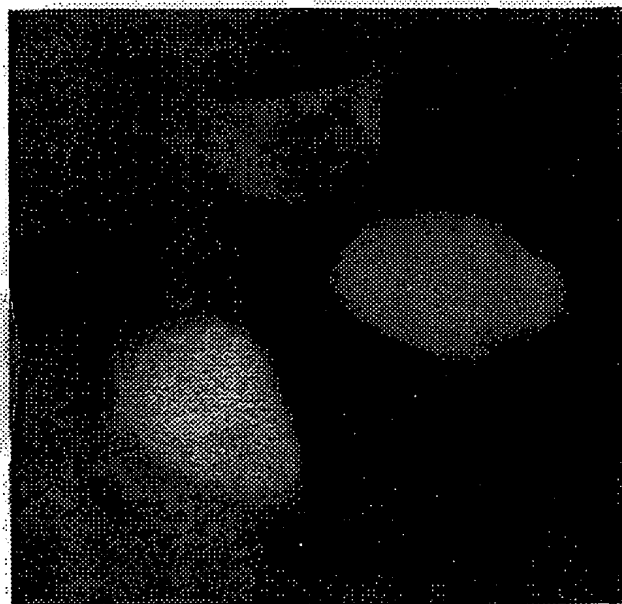
Noyaux marqués au DAPI



Noyaux marqués par anti OZF



Noyaux marqués au DAPI



Noyaux marqués par anti OZF

FIGURE 6  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/7



FIGURE 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
<b>PEPTIDE</b>				L	S	Q	Q	K	I	<u>Y</u>	S	G	E	N	P	F	A	+
<b>MBP-OZF</b>	S	S	R	V	D	L	Q	K	I	<u>Y</u>	S	G	E	N	P	F	A	+
<b>hu-OZF</b>	M	S	H	L	S	Q	Q	K	I	<u>Y</u>	S	G	E	N	P	F	A	+
<b>hu-OZF</b>	M	S	H	L	S	Q	Q	R	I	<u>Y</u>	S	G	E	N	P	F	A	+
<b>bo-OZF</b>	M	S	H	L	S	Q	Q	R	I	L	S	G	E	N	P	F	A	-
<b>mu-OZF</b>	M	S	H	L	S	Q	Q	R	I	C	S	G	G	S	P	F	A	-
							*	o	*		*	*			*	*	*	

FIGURE 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**  
**— (11) —**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.

PCT/FR 99/02133

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/18 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/68 C12N5/10  
A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FERBUS D ET AL: "Identification, nuclear localization, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 236, no. 3, 15 March 1996 (1996-03-15), pages 991-995, XP002095518 cited in the application the whole document --- -/--	1-17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2000

Date of mailing of the international search report

01/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
FR 99/02133

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LE CHALONY C ET AL: "The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 236, no. 2, 18 February 1994 (1994-02-18), pages 399-404, XP002095520 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
P,A	<p>FERBUS D ET AL: "Amplification and over-expression of OZF, a gene encoding a zinc finger protein, in human pancreatic carcinomas" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 3, 29 January 1999 (1999-01-29), pages 369-372, XP002095519 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
T	<p>DATABASE HCAPLUS 'Online! 14869, 2000 FERBUS D ET AL: "Production and characterization of mouse monoclonal antibodies to human zinc finger OZF protein overexpressed in pancreatic carcinomas." XP002127523 abstract &amp; HYBRIDOMA, vol. 18, no. 5, 1999, pages 431-6, abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 99/02133

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C07K16/18 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/68 C12N5/10 A61K47/48		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FERBUS D ET AL: "Identification, nuclear localization, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 236, no. 3, 15 mars 1996 (1996-03-15), pages 991-995, XP002095518 cité dans la demande le document en entier --- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 janvier 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 01/02/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Le Flao, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Internationale No  
FR 99/02133

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LE CHALONY C ET AL: "The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 236, no. 2, 18 février 1994 (1994-02-18), pages 399-404, XP002095520 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
P,A	<p>FERBUS D ET AL: "Amplification and over-expression of OZF, a gene encoding a zinc finger protein, in human pancreatic carcinomas"</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 3, 29 janvier 1999 (1999-01-29), pages 369-372, XP002095519 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
T	<p>DATABASE HCAPLUS 'Online! 14869, 2000</p> <p>FERBUS D ET AL: "Production and characterization of mouse monoclonal antibodies to human zinc finger OZF protein overexpressed in pancreatic carcinomas."</p> <p>XP002127523 abrégé &amp; HYBRIDOMA, vol. 18, no. 5, 1999, pages 431-6, abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17